



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C07K 7/08, A61K 39/36 G01N 33/68		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/10194 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Mai 1994 (11.05.94)						
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT93/00163 (22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 1993 (25.10.93) (30) Prioritätsdaten: <table><tr><td>A 2125/92</td><td>27. Oktober 1992 (27.10.92)</td><td>AT</td></tr><tr><td>A 43/93</td><td>14. Januar 1993 (14.01.93)</td><td>AT</td></tr></table> (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIO-MAY PRODUKTIONS- UND HANDELSGESELLSCHAFT M.B.H.[AT/AT]; Herrenstrasse 2, A-4020 Linz (AT). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : EBNER, Christof [AT/AT]; St. Elisabethplatz 4/13, A-1040 Wien (AT). FERREIRA, Fatima [BR/AT]; De Quergasse 6/3, A-1170 Wien (AT). SCHENK, Siegfried [AT/AT]; Schönlaterngasse 8/33, A-1010 Wien (AT). SZEPFALUSI, Zsolt [AT/AT]; Gaullachergasse 10, A-1160 Wien (AT). VALENTA, Rudolf [AT/AT]; Beethovenstrasse 18, A-2604 Theresienfeld (AT). BREITENBACH, Michael [AT/AT]; Helfertgasse 44, A-1120 Wien (AT). KRAFT, Dietrich [AT/AT]; Rebenweg 1/18/1, A-1170 Wien (AT). RUMPOLD, Helmut [AT/AT]; Buchleitengasse 8/3, A-1180 Wien (AT). SCHEINER, Otto [AT/AT]; Hohe Wandstrasse 40, A-2364 Marianenzersdorf (AT).		A 2125/92	27. Oktober 1992 (27.10.92)	AT	A 43/93	14. Januar 1993 (14.01.93)	AT	(74) Anwälte: ITZE, Peter usw. ; Amerlingstr. 8, A-1061 Wien (AT). (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, JP, NO, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
A 2125/92	27. Oktober 1992 (27.10.92)	AT							
A 43/93	14. Januar 1993 (14.01.93)	AT							
(54) Title: MOLECULE FRAGMENTS (PEPTIDES) OF THE MAIN ALLERGENS CONTAINED IN THE POLLEN OF TREES OF THE FAGALES ORDER									
(54) Bezeichnung: MOLEKÜLFRAGMENTE (PEPTIDE) DER HAUPTALLERGENE DER POLLEN VON BÄUMEN DER ORDNUNG FAGALES									
(57) Abstract <p>The invention concerns the T-cell epitope of a 17 kD protein present as the main allergen contained in the pollen of trees of the <i>Fagales</i> order, in particular birches, hazels and alders, or generated by genetic engineering as a recombinant protein. Because of the high degree of affinity between said trees, their respective 17 kD proteins are also highly homologous. These proteins are designed as Bet v I, Cor a I and Aln g I in the international literature and cause tree pollen allergies in predisposed persons (allergic patients). The peptides derived from the main allergens (major allergens), in particular Bet v I, are suitable for diagnosing tree pollen allergy and are capable of stimulating (causing the proliferation, the cytokine production) or blocking T-cells of the patients <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> in an allergen-specific manner, or to provoke tolerance to the allergen specific T-cells.</p>									
(57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung bezieht sich auf T Zell Epitope eines 17 kD Proteins, das als Hauptallergen der Baumpollen der Order <i>Fagales</i>, insbesondere Birke, Hasel und Erle in der Natur vorkommt oder auf gentechnologischem Wege als rekombinantes Protein erzeugt wird. Aufgrund der nahen Verwandtschaft der genannten Bäume besteht eine hohe Homologie auch der jeweiligen 17 kD Proteine, die gemäß der internationalen Literatur als Bet v I, Cor a I und Aln g I bezeichnet werden und in disponierten Personen (Allergikern) Baumpollenallergien hervorrufen. Die von den Hauptallergenen (major allergens), insbesondere Bet v I abgeleiteten Peptide eignen sich für die Diagnose der Baumpollenallergie und sind imstande T Zellen der Patienten <i>in vitro</i> wie <i>in vivo</i> allergen-spezifisch zu stimulieren (Proliferation, Zytokinproduktion) oder zu blockieren bzw. zu einer Toleranz der allergenspezifischen T Zellen zu führen.</p>									

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowakenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Molekülfragmente (Peptide) der Hauptallergene der Pollen von Bäumen der
Ordnung *Fagales*

5 1. Gegenstand der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf Molekülfragmente (Peptide) der Hauptallergene der Pollen von Bäumen der Ordnung *Fagales*, insbesondere von Birken, Haseln und Erlen. Im speziellen bezieht sich die Erfindung auf von Baumpollen-Allergenen
10 abgeleitete Peptidsequenzen, die im Rahmen der pathologischen Immunantwort für die überschießende IgE Antikörperproduktion der Baumpollenallergiker verantwortlich zu machen sind. Diese Peptide können sowohl innerhalb einer verbesserten Allergiediagnostik als auch *in vitro* und *in vivo* zur Induktion einer Immuntoleranz bzw. Anergie von allergenspezifischen T Zellen Verwendung finden.

15

2. Umfeld der Erfindung

Epidemiologische Studien zeigen, daß in den westlichen Industrieländern eine ständige Zunahme von Typ I Allergien (allergische Rhinitis, allergische
20 Conjunctivitis, allergisches Asthma) zu beobachten ist (1,2). Insbesondere kommt es durch den Pollenflug im Frühling und Frühsommer in den Ländern der nördlichen Hemisphäre zu den genannten IgE-bedingten Erkrankungen. Proteine von Pollen der Bäume der Order *Fagales*, speziell von Pollen der Birke, der Hasel, der Erle, der Hainbuche, der Eiche und der Edelkastanie können im Frühjahr für das Auftreten der
25 genannten Allergien verantwortlich gemacht werden (3). Wenigstens 30-40% der Pollenallergien sind durch diese Pollenallergene hervorgerufen. Diese Allergien werden durch IgE Antikörper ausgelöst, die Effektorzellen (Mastzellen der Schleimhäute und des Bindegewebes, basophile Granulozyten des Blutes) besetzen und bei Verbindung mit Pollenallergen zu einer Freisetzung von Entzündungsstoffen
30 führen (4). Die Bildung solcher IgE Antikörper erfolgt durch B Lymphozyten, die in Kooperation mit T Lymphozyten über deren lösliche Faktoren bzw. Zellkontakte

stimuliert werden (5). Am Beginn dieser Immunantwort stehen allergenpräsentierende Zellen (Monozyten, Makrophagen, Dendritenzellen etc.), die die Allergene aufnehmen, intrazellulär verarbeiten, um sie dann in Form von hochimmunogenen Peptiden zusammen mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) T Lymphozyten darzubieten (6). Demnach spielen T Zellen innerhalb der IgE Antwort eine ganz bedeutende Rolle, da sie in allergenspezifischer Weise sowohl durch Zellkontakt als auch durch die Produktion von Zytokinen zur Aktivierung der B Lymphozyten führen und die überschießende IgE Produktion der B Zellen, bzw. der sich aus diesen entwickelnden Plasmazellen einleiten.

Unter Verwendung von Pollenextrakten und gereinigten Allergenen sind in den letzten Jahren zahlreiche Tests für die Diagnose IgE bedingter Allergien entwickelt worden. Diese Testsysteme umfassen RIA (Radioimmunassay), IRMA (Immunradiometrische Assay), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay) LIA (luminescence immunoassay), Immunoblots, Histamine-release-assay, T Zell Proliferationsassay und andere. Durch den Einsatz von allergenabgeleiteten gentechnologisch hergestellten oder synthetisierten Peptiden, die T Zell Erkennungsarealen entsprechen, kann in Zukunft sicherlich eine Verbesserung der genannten Testsysteme erreicht werden.

Seit Jahrzehnten werden IgE bedingte Allergien, insbesondere Pollenallergien durch die sogenannte Hyposensibilisierung therapiert (7). Diese Therapie besteht in der Zufuhr von Allergenextrakten in Form von Injektionen oder peroraler Applikation in wässriger Form als Tropfen oder als Nasenspray bzw. Augentropfen, in steigender Dosierung bis zur Erreichung einer Erhaltungsdosis über mehrer Jahre. Effekte dieser Immuntherapie sind das Erreichen einer Toleranz gegenüber den eingesetzten Allergenen, was sich klinisch in einer deutlichen Abnahme der angeführten Krankheitssymptome bzw. in einer vollkommenen Symptomlosigkeit äußert (8). Da derzeit bei dieser Art der Behandlung immunogene Allergenpräparationen eingesetzt werden, sind Nebenwirkungen sehr häufig zu beobachten. Bei Einsatz von allergenabgeleiteten, aber nichtanaphylaktisch wirkenden Peptiden, könnten risikolos höhere Dosen gegeben und damit eine

wesentliche Verbesserung der Hyposensibilisierung erreicht werden. Weiters bestehen aufgrund unserer Untersuchungen deutliche Hinweise für spezielle T Zell Bindungsareale auf Allergenen, sogenannte Epitope, die einerseits die Fähigkeit besitzen T Lymphozyten zu stimulieren und zur Proliferation anzuregen (siehe 5 Tabelle 1, in welcher ein Beispiel für T Zellklonreaktivität für die einzelnen Peptide angeführt ist), andererseits - in hohen Dosen - diese Zellen auch in einen Zustand der Toleranz bzw. Nicht-Reaktivität (Anergie) zu versetzen (9).

Die vorliegende Erfindung betrifft somit allergenabgeleitete Peptidsequenzen von Bet v 1, dem Hauptallergen von Birkenpollen, welche die Fähigkeit haben 10 Bet v I spezifische T Zellen bzw. Zellklone von Birkenpollen-Allergikern in der oben genannten Art zu beeinflussen. Aufgrund der hohen Homologie der "major allergens" Bet v I, Cor a I und Aln g I (10) sind die genannten Peptide weiters in der Lage in gleicher Weise T Zellen bzw. Zellklone von Patienten, die auf Hasel- oder Erlenpollen oder Pollen von anderen Bäumen der Order Fagales reagieren, in der 15 oben genannten Weise zu beeinflussen (siehe Tabelle 1, welche ein Beispiel für die Kreuzreaktivität der entsprechenden T Zellklone bezüglich der Allergene Bet v I, Cor a I und Aln g I wiedergibt). Das bedeutet, daß eine Therapie mit solchen, aufgrund einer Homologie über 75%, kreuzreaktiven Peptiden geeignet ist eine Toleranz in Baumpollenallergikern zu erzeugen.

20

Tabelle 1: Kreuzreaktivität Bet v I-spezifischer Zellklone mit Cor a I und Aln g I

	KLON	HC26	SS6	DF16	HC5	FS5	AS27	BE15
25	NEG KO	0,5	0,5	0,4	0,2	0,03	0,1	0,06
	BET v I nat	11,9	9,03	32,2	90,4	1,43	5,7	66,8
	BET v I rec	6,5	5,77	30	87,7	5,24	4,5	75,7
	COR a I	ND	12,6	23,1	57,4	ND	10,4	65,9
30	ALN g I	ND	9,46	9,2	28,5	ND	9,3	28,7

Werte sind cpm (counts per minute) x 1000

ND: Experiment nicht durchgeführt

3. Beispiele

5

3.1. Primärantwort der T-Lymphozyten von Birkenpollenallergikern:

Blutabnahme erfolgte bei atopischen Patienten (typische Anamnese für eine Birkenpollenallergie, positiver Hauttest mit Birkenpollenallergenen, RAST-Klasse 3-5 mit Birkenpollenallergenen). Die Gewinnung von mononukleären Leukozyten 10 (PBMC) aus heparinisiertem Blut erfolgte mittels Gradientenzentrifugation (Ficoll). Lymphozytenaktivierung wurde folgendermaßen durchgeführt: Ansatz von 100.000 Zellen/Napf in 96-näpfigen Kulturplatten mit verschiedenen Bet v I Konzentrationen (zwischen 50 und 5 ug/ml). 5 Tage später Zugabe von 3H-Thymidin für weitere 12 Stunden, dann Auswertung der Lymphozytentransformation.

15

3.2. Allgenspezifische T Zelllinien:

500.000 PBMC wurden anschließend in 2 ml Medium (24-näpfige Kulturplatte) in Anwesenheit von Bet v I in optimaler Konzentration (im obengenannten Vorversuch bei jedem einzelnen Patienten ermittelt) kultiviert. Die stimulierbaren 20 T-Zellen (mit Bet v I Spezifität) exprimierten vermehrt Interleukin-2 (IL-2) Rezeptoren an ihrer Oberfläche und begannen sich zu Blasten zu transformieren und zu teilen. Diese Blastentransformation wurde nach 5 Tagen durch die Zugabe von IL-2 unterstützt. Nach 10-14 Tagen dominierten Bet v I spezifische Zellen in der Kultur. Diese wurden dann nach einem "limiting dilution" Verfahren auf 0,3 Zellen 25 pro Napf in Anwesenheit von 100.000 bestrahlten PBMC als "feeder-Zellen" in 96-näpfigen Platten ausklontiert. Wachsende Kulturen wurden expandiert, auf ihre Spezifität überprüft, mittels Durchflußzytometrie (FACScan) phänotypisiert und dann den geplanten Untersuchungen zugeführt.

30

3.3. Charakterisierung von T Zellepitopen des Bet v I Moleküls:

Die Bindungsareale der Bet v I-spezifischen T Zellklone am Allergen wurden in Proliferationsversuchen (^3H -ThymidinEinbau) durch die Zugabe von jeweils einem Peptid ermittelt. Zu diesem Zweck wurde die Reaktivität auf Dodekapeptide getestet, die entsprechend der Aminosäuresequenz von Bet v I synthetisiert worden 5 waren. Diese Peptide überspannten jeweils 10 gemeinsame Aminosäuren und überlappten mit den zwei in der Sequenz folgenden. Im einzelnen wurde so vorgegangen: im ersten Durchgang wurden jeweils 20.000 Zellen des Bet v I spezifischen Klons mit autologen bestrahlten PBMC (Antigen-präsentierende Zellen) und jeweils 1 μg Peptid der eingesetzten 75 Peptide pro Napf inkubiert. Als 10 Positivkontrolle dienten gereinigte native und rekombinante Bet v I Moleküle (2 μg /Napf) sowie Werte einer maximalen T Zellstimulation durch die Kombination von Phytohämagglutinin A und IL-2. Als Negativkontrolle wurden Ansätze verwendet, die in den Näpfen nur Klonzellen allein bzw. Klonzellen mit autologen bestrahlten feeder Zellen ohne Zugabe von Antigen bzw. Peptid inkubiert worden waren. Jene Peptide, 15 die eine starke Proliferation des Klons hervorriefen, wurden in einem zweiten Proliferationsversuch in dreifach-Ansätzen getestet, um die Spezifität des Klons für die entsprechende Aminosäuresequenz zu sichern.

Auf diese Weise wurden 30 Bet v I-spezifische T Lymphozytenklone von 9 Patienten gewonnen, das heißt, daß von jedem Patienten mehrere Klone auf 20 Peptidreaktivität getestet werden konnten. Folgende Peptide führten zu einer Reaktivität der als repräsentative Beispiele genannten T Zellklone (siehe Tabelle 2):

	Aminosäuren	
	Position in der Bet v I Sequenz:	Bezeichnung der Klone
25		
GVFNYETETTSVIPAA	1 - 16	HC26
TTSVIPAAARLFKAFIL	9-26	SS6
DNLFPKVAPQAISSE	29-44	SAZ53/III
30 PQAISSEVENIEGNG	35-48	HC3/III

6

	GFPFKYVKDRVDEVDHTN	61 -76	DF16
	DHTNFKYNYSVIEGGP	75-90	HC5
	YSVIEGGPIGDTLEKI	84-97	FS5
5	DTLEKISNEIKIVATPDG	93-110	HC2/III
	GSILKISNKYHTKGDH	111-126	AS2 7
	ETLLRAVESYLLAHSDAYN	141-159	BE15

10

15

20

25

30

Tabelle 2: Reaktivität Bet v I-spezifischer Lymphozytenklone.
Je ein repräsentatives Experiment mit einem Klon pro Epitop ist angeführt

KLON	HC26	SS6	SAZ53III	HC3III	DF16	HCS	FSS	HC2III	AS27	BE15
NEG KO	0,5	0,5	3,1	1,2	0,16	0,06	0,03	0,9	0,1	0,14
BET v I nat	11,9	9,03	41,1	31,9	51,6	69,3	5,24	78	5,7	8,51
BET v I rec	6,5	5,77	52,9	29,6	50,7	68,1	1,43	ND	4,5	10,6
Aminosäuren	1 bis 16	9 bis 26	29 bis 44	35 bis 48	61 bis 76	75 bis 90	84 bis 97	93 bis 110	111 - 126	141 - 159
EPITOP	47,2	30	28,9	29,1	48,8	34,4	1,73	78,6	2,46	10,2

Werte entsprechen cpm (counts per minute) x 1000

ND: Experiment wurde nicht durchgeführt

Internationaler Ein-Buchstaben-Kode für Aminosäuren:

- 5 A: Alanin
 C: Cystein
 D: Asparaginsäure
 E: Glutaminsäure
 F: Phenylalanin
10 G: Glycin
 H: Histidin
 I: Isoleucin
 K: Lysin
 L: Leucin
15 M: Methionin
 N: Asparagin
 P: Prolin
 Q: Glutamin
 R: Arginin
20 S: Serin
 T: Threonin
 V: Valin
 W: Tryptophan
 Y: Tyrosin
25

30

4. Literatur

1. Wüthrich B. Allergy and Clin Immunol News 3, 41 (1991).
- 5 2. Miyamoto, T., Advances in Allergology and Clinical Immunology.
Eds. Ph Godard, J. Bousquet, F.B. Michel. EAACI Congress Paris, 10-15
May 1992, The Parthenon Publishing Group, Casterton Hall U.K., New
Jersey, U.S.A. p. 343.
3. Jarolim E., Rumpold, H., Endler, A.T., et al. Allergy 44, 385 (1989).
- 10 4. Roitt, I., Essential Immunology. 6th Edition 1991.
5. Parronchi, P., Macchia, D., Piccini, M.P., et al. Proc. Natl. Acad.
Sci.U.S.A. 88, 4538 (1991).
6. Schwartz, R. H. Ann. Rev. Immunol. 3, 237 (1985).
7. Bousquet, J., Becker W.M., Hejjaoudi, A., et al. J Allergy Clin
15 Immunol 88, 43 (1991).
8. Birkner, T., Rumpold H., Jarolim, E., et al. Allergy 45, 418 (1990).
9. Rothbard, J.B., Gefter, M.L., Ann Rev Immunol 9, 527 (1991).
10. Valenta, R., Breiteneder H., Pettenburger K., et al. J Allergy Clin
Immunol 87, 677 (1991).

20

25

30

Patentansprüche

- 5 1. Molekülfragmente (Peptide) der Hauptallergene der Pollen von Bäumen der Ordnung Fagales insbesondere von Birken, Haseln und Erlen, dadurch gekennzeichnet, daß sie T Zellklone oder T Zelllinien, die von gegen Pollen der Ordnung Fagales allergischen Patienten stammen, allergenspezifisch stimulieren oder blockieren, das heißt zur Toleranz (Anergie) dieser T Zellen führen, und wenigstens
10 eines der aus der folgenden Gruppe ausgewählten Peptide:

GVFNYETETTSVIPAA

TTSVIPAAARLFKAFIL

DNLFPKVAPQAISSE

PQAISSEVENIEGNG

- 15 GFPFKYVKDRVDEVDHTN

DHTNFKYNYSVIEGGP

YSVIEGGPIGDTLEKI

DTLEKISNEIKIVATPDG

GSILKISNKYHTKGDH

- 20 ETLLRAVESYLLAHS DAYN

aufweisen, bzw. Peptide, die zu den genannten Peptiden kreuzreaktive Eigenschaften zeigen.

2. Molekülfragmente nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie zu den
25 angeführten Molekülfragmenten eine hohe Homologie, insbesondere über 75% besitzen.

3. Molekülfragmente nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie zu den
angeführten Peptiden eine hohe Homologie, insbesondere über 75%, besitzen, *in*
30 *vitro* und *in vivo* zu einer T Zell Toleranz führen können und sich daher zur
Diagnostik und Therapie allergischer Erkrankungen eignen.